

PAULO MARTINS SOARES FILHO

**DETERMINAÇÕES DE IMUNOGLOBULINAS G, INIBIDORES DE  
TRIPSINA E LACTOFERRINA EM COLOSTROS DE VACAS  
MISTIÇAS HOLANDÊS-ZEBU**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
NOVEMBRO – 2000

PAULO MARTINS SOARES FILHO

**DETERMINAÇÕES DE IMUNOGLOBULINAS G, INIBIDORES DE  
TRIPSINA E LACTOFERRINA EM COLOSTROS DE VACAS  
MISTIÇAS HOLANDÊS-ZEBU**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 21 de agosto de 2000

---

Prof. José Ivo Ribeiro Júnior  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Goreti de Almeida  
Oliveira  
(Conselheira)

---

Prof. Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo

---

Prof. José Eurico de Faria

---

Prof. Pacífico Antônio Diniz Belém  
(Orientador)

## **BIOGRAFIA**

Paulo Martins Soares Filho, filho de Paulo Martins Soares e de Maria Imaculada Chaves Soares, nasceu no dia 05 de julho de 1974, em Ponte Nova – MG.

Em abril de 1992, iniciou o curso de graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa (UFV) – MG, graduando-se em dezembro de 1997.

Em março de 1998, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária na UFV, nível MS, defendendo tese em agosto de 2000.

## **AGRADECIMENTO**

A Deus pela presença em todos os momentos.

Aos meus pais, pelo empenho em proporcionar-me uma educação digna e por ensinar-me a valorizá-la com humanidade.

Aos amigos por compartilharmos nossos caminhos.

Aos colegas, pelo companheirismo durante esta jornada.

Ao professor Pacífico Antônio Diniz Belém, pela amizade, pela orientação dedicada e criteriosa e pelos ensinamentos que vão além da vida acadêmica.

Aos senhores proprietários dos estabelecimentos leiteiros por permitirem a coleta do material de trabalho.

Aos professores Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo e José Ivo Ribeiro Júnior, pela presteza, pela paciência, pelos aconselhamentos e, acima de tudo, pela amizade.

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, pela orientação na realização dos testes com inibidores de tripsina.

A Aline Prates, Márcio Mendes e Arlindo Inês Teixeira, pelos ensinamentos e pela dedicada ajuda na condução das análises laboratoriais.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, em especial aos professores, alunos e funcionários do Departamento de Veterinária.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos recursos financeiros.

Ao Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade concedida.

Aos erros e às dificuldades por terem sido verdadeiros mestres.

## CONTEÚDO

EXTRATO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
INTRODUÇÃO .....	1
REVISÃO DE LITERATURA .....	3
CAPÍTULO 1 – CONCENTRAÇÕES DE IgG EM COLOSTROS DE VACAS MISTIÇAS HOLANDÊS-ZEBU.....	7
1. INTRODUÇÃO .....	7
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	9
2.1. Concentração de IgG .....	10
2.2. Análise dos Dados .....	13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	14
4. RESUMO E CONCLUSÕES .....	20
CAPÍTULO 2 – NÍVEIS DE INIBIDORES DE TRIPSINA E LACTOFERRINA EM COLOSTROS DE VACAS MISTIÇAS HOLANDÊS-ZEBU.....	22
1. INTRODUÇÃO .....	22
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	25
2.1. Inibidores de Tripsina.....	26
2.2. Lactoferrina .....	28

2.3. Análise dos Dados .....	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
4. RESUMO E CONCLUSÕES .....	38
RESUMO E CONCLUSÕES .....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42

## EXTRATO

SOARES FILHO, Paulo Martins, M.S., Universidade Federal de Viçosa, novembro, 2000. **Determinações de imunoglobulinas G, inibidores de tripsina e lactoferrina em colostros de vacas mestiças holandês-zebu.** Orientador: Pacífico Antônio Diniz Belém. Conselheiros: José Ivo Ribeiro Júnior, José Mário da Silveira Mezêncio e Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Essa pesquisa foi conduzida em seis fazendas de criação de bovinos leiteiros mestiços holandês-zebu de diferentes graus de sangue, localizadas nas microrregiões de Ponte Nova e Viçosa, Minas Gerais. Os objetivos consistiram em conhecer os níveis de IgG, inibidores de tripsina e lactoferrina encontrados em colostros dos referidos animais. Para isso, as determinações de IgG e de lactoferrina foram feitas através de imunodifusão radial simples e, no caso dos inibidores de tripsina, foi empregada técnica colorimétrica, utilizando-se o substrato sintético D-L, BApNA. Os níveis médios de IgG (154,94 mg/ml) e de inibidores de tripsina (0,9577 mg de tripsina inibida/ml) não foram influenciados pelos diferentes grupos de graus de sangue e se apresentaram muito superiores aos relatados para raças taurinas puras. A grande amplitude verificada para o intervalo de confiança envolvendo níveis médios de IgG não tem implicações práticas, já que seu limite inferior de 134 mg/ml é bastante elevado. Por outro lado, em se tratando de lactoferrina, vacas com mais de 75% de grau de sangue holandês apresentaram concentrações médias mais altas que as pertencentes aos



demais grupos de grau de sangue. Para essa última característica, os valores médios verificados em cada grupo (1 a 4) foram, respectivamente, 0,65 mg/ml, 0,82 mg/ml, 1,58 mg/ml e 0,96 mg/ml, mas a alta variabilidade encontrada não permitiu obter uma estimativa média representativa, segundo os diferentes grupos estabelecidos. Concluiu-se, então, que, na maioria das vezes, não se justifica o emprego de métodos artificiais de fornecimento do colostro em se tratando de animais mestiços holandês-zebu. Em tese, bastaria que se recorresse à mamada natural assistida, nas primeiras horas de vida, para assegurar que bezerros mestiços holandês-zebu venham a receber adequadas concentrações de anticorpos colostrais necessários à transferência de imunidade passiva.

## ABSTRACT

SOARES FILHO, Paulo Martins., M.S., Universidade Federal de Viçosa, november, 2000. **Immunoglobulin G, trypsin inhibitor and lactoferrin concentrations in colostrum from crossbred holstein-zebu dairy cows.** Adviser: Pacífico Antônio Diniz Belém. Committee members: José Ivo Ribeiro Júnior, José Mário da Silveira Mezêncio and Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Colostrum samples from 88 crossbred holstein-zebu (HZ) dairy cows were analyzed for immunoglobulin G (IgG), trypsin inhibitor (TI) and lactoferrin (LF) concentrations. The first and the last were determined by single radial immunodiffusion and TI by colorimetric procedure with D,L-BApNA chromogenic substrate of trypsin. Mean colostrum levels of IgG and TI were 145,97 mg/ml and 0,9577 mg of trypsin inhibited/ml, respectively. Both were not influenced by group of crossbred HZ. Additionally, it was observed that the large confidence interval of IgG mean was not important because its low limit (134 mg/ml) is so high. Lactoferrin concentrations were affected by crossbred groups and the means were 0,65 mg/ml, 0,82 mg/ml, 1,58 mg/ml and 0,96 mg/ml for each group of cows. Crossbred cows with >75% HZ showed higher LF concentrations, although a representative general mean could not be obtained due its high variability. Considering these results, mainly IgG concentrations, it was concluded that it is not necessary an artificial method of feeding colostrum to

crossbred holstein-zebu calves. Probably, the assisted natural sucking as soon after birth as possible is sufficient to get passive immune transfer.

## INTRODUÇÃO

Bezerros, normalmente, nascem hipo ou agamaglobulinêmicos, porque suas características placentárias impedem a transferência de imunidade passiva durante a gestação. Por conseguinte, esses animais são dependentes de práticas de manejo que objetivem protegê-los contra diversos agentes infecciosos com os quais se deparam logo ao nascer. Nesse sentido, o fornecimento adequado de colostro, nas primeiras horas de vida, é de fundamental importância para que os recém-nascidos possam adquirir fatores de imunidade de origem materna contra tais patógenos (BANKS e McGUIRE, 1989; TIZARD, 1996).

As imunoglobulinas colostrais são importantes para redução das taxas de morbidade e mortalidade de bezerros e para a melhoria dos índices de desempenho desses animais (SELIM et al., 1995; PERINO et al., 1995; DONOVAN et al., 1998). Daí elas serem consideradas os principais fatores de proteção transferidos pelo colostro (REITER, 1978). Entretanto, quando o bezerro mama o colostro, outros constituintes como células, fatores antimicrobianos inespecíficos e inibidores de tripsina são também ingeridos e desempenham importantes funções, na medida em que favorecem a absorção ou potencializam a ação das imunoglobulinas e modulam a resposta imune no recém-nascido.

Deve-se chamar a atenção para o fato de que os rebanhos leiteiros nacionais contêm, predominantemente, vacas mestiças holandês-zebu, das quais muito pouco se conhece sobre as variações de seus constituintes colostrais de importância na imunidade neonatal. Por isso mesmo esta pesquisa foi conduzida, e seus objetivos consistiram em conhecer os níveis de imunoglobulinas G (IgG), inibidores de tripsina e lactoferrina encontrados em colostros das referidas vacas.

Acredita-se que a inexistência de informações neste sentido dificulte a avaliação das práticas de manejo de colostro e de criação de bezerras adotadas em nosso meio, quanto a seus reflexos na profilaxia de doenças que acometem esses animais. Por certo, os conhecimentos gerados com essas pesquisas poderão nortear a implementação de recomendações aplicáveis a propriedades com características semelhantes às aquelas onde foram conduzidos os estudos aqui registrados.

## REVISÃO DE LITERATURA

WATTIAUX (1997) afirma que tanto as concentrações de imunoglobulinas quanto a diversidade delas precisam ser levadas em conta quando se pensa em colostros de boa qualidade. Esses colostros, necessariamente, devem ser ricos em anticorpos específicos, capazes de conferir ao recém-nascido imunidade contra os diversos agentes do ambiente onde ele vive.

Considerando-se que a maior parte dos anticorpos encontrados no sangue do bezerro neonato advêm da ingestão do colostro logo após o parto (WATTIAUX, 1997), é fundamental que estes animais venham a ingerir um produto de alta qualidade nas primeiras horas de vida, ocasião em que sua parede intestinal se encontra muito permeável aos constituintes dessa secreção. Na medida em que este mesmo fenômeno pode favorecer, também, a absorção de microrganismos ingeridos, a proteção através da administração do colostro deve se antecipar à ingestão de patógenos do ambiente (CAMPOS e LIZIERE, 1998).

As concentrações de imunoglobulinas do colostro variam de acordo com a duração do período seco (WATERMAN, 1998), exposições prévias da vaca aos diversos agentes, volume de colostro produzido, estação do ano e raça, dentre outros (A GUIDE TO COLOSTRUM ..., 1998).

Segundo WATTIAUX (1997), em vacas holandesas, as concentrações de imunoglobulinas colostrais variam entre 2 e 23%, com média de 6%. PRITCHETT et al. (1991) encontraram uma concentração média de imunoglobulinas G no colostro de vacas holandesas equivalente a 48,2 g/l, e amplitude variando de 20 g/l até valores superiores a 100 g/l. QUIGLEY et al. (1994), por outro lado, verificaram que o colostro de vacas jersey possui, em média, 66 g/l de IgG, com amplitude de 28 a 115 g/l. Essa grande variação nas concentrações de imunoglobulinas dificulta um manejo mais acurado do colostro, e a diferença entre 20 e 100 g/l de IgG pode significar falha ou sucesso na transferência de imunidade passiva (A GUIDE TO COLOSTRUM ... 1998).

GAY e BESSER (1991) comprovaram que cerca de 55% dos colostros de vacas nos EUA contêm menos de 100 g de IgG<sub>1</sub> em dois litros e que 10% deles não atingem esta concentração nem em quatro litros.

Para QUIGLEY (1997), a concentração de imunoglobulinas do colostro é o principal fator a ser considerado na definição do volume que o animal deve mamar, pois o que se está procurando é administrar imunoglobulinas e não o colostro.

RADOSTITS et al. (1994) preconizam que o bezerro deve ingerir de 80 a 100g de imunoglobulinas, para que ele consiga alcançar níveis séricos adequados para enfrentar desafios de patógenos do ambiente. Daí, BESSER et al. (1991) recomendarem que as concentrações de imunoglobulinas do colostro devam exceder 30 mg/ml ou até mesmo 50 mg/ml, para assegurar que as 100 g requeridas por bezerras da raça holandesa sejam disponibilizadas nos dois litros de colostro que normalmente lhes são fornecidos durante as primeiras doze horas de vida.

STOTT et al. (1979) salientam que a alta concentração de imunoglobulinas do colostro é importante na transferência de imunidade passiva, pois ela é capaz de estimular a atividade pinocítica de um número maior de células intestinais. Nesse sentido, torna-se interessante fornecer colostros ricos em imunoglobulinas aos bezerros imediatamente após o nascimento, pois a capacidade de absorção das células intestinais é finita e esta prática também

reduz o risco de ocupação dos sítios receptores por outras macromoléculas, o que comprometeria a transferência de imunidade passiva ao neonato (STALEY e BUSH, 1985; HOPKINS e QUIGLEY, 1997).

No colostro de vacas, encontram-se, ainda, níveis elevados de inibidores de tripsina, que são capazes de preservar as imunoglobulinas G e outros constituintes proteicos da digestão, embora eles praticamente não tenham qualquer ação sobre outras enzimas proteolíticas (LASKOWSKI e LASKOWSKI, 1951; BROCK et al., 1978; PIÑEIRO et al., 1978; JENSEN, 1978; QUIGLEY et al., 1995b e 1995c; BAINNER e CSAPÓ, 1996). Dentre os inibidores colostrais de tripsina, uma família constituída de quatro isoformas é resistente ao congelamento, descongelamento e aquecimento às mesmas temperaturas capazes de preservar a integridade das imunoglobulinas colostrais. Além disso, esses inibidores não são inativados pela acidez do abomaso e respondem por 60 a 70% da atividade antitripsina (LASKOWSKI e LASKOWSKI, 1951; PIÑEIRO et al., 1975; CHECOVÁ, 1976; SANDHOLM e HONKANEN-BUZALSKI, 1979).

Considerando-se o colostro obtido na primeira ordenha pós-parto, PIÑEIRO et al. (1978) verificaram que os níveis de inibidores de tripsina em soros de colostros de vacas são da ordem de 0,798 mg de tripsina inibida/ml. No colostro total, por sua vez, HONKANEN-BUZALSKI e SANDHOLM (1981) e QUIGLEY et al. (1995b) relataram, respectivamente, 0,5 mg/ml e 0,56 mg/ml.

A adição de um inibidor de tripsina extraído do colostro de porcas à dieta de leitões promoveu aumento da absorção de IgG e IgA (JENSEN e PEDERSEN, 1982). No entanto, a literatura não registra estudos similares em bezerros.

QUIGLEY et al. (1995c) conseguiram, também, aumentar a absorção de imunoglobulinas, inclusive IgM, quando adicionaram inibidor de tripsina extraído da soja ao colostro de vacas. Esse efeito na absorção de IgM foi atribuído ao fato de que a referida substância é capaz de inibir, também, a quimotripsina. Apesar dos resultados alcançados, os autores são da opinião de que essa prática é economicamente inviável em função dos altos custos do inibidor de tripsina da soja.



Além de imunoglobulinas, o colostro de vacas contém lactoferrina e outros fatores antimicrobianos inespecíficos, que desempenham importante papel na imunidade neonatal. A lactoferrina se acha presente no colostro total de vacas em concentrações de 2 a 5 mg/ml (REITER, 1978), e, no soro dessa secreção, alcança 1,82 mg/ml (NONNECKE e SMITH, 1984).

TSUJI et al. (1990) encontraram, respectivamente, as seguintes concentrações de lactoferrina no colostro total de vacas holandesas, jersey, “japanese black” e “japanese brown”: 1,96 mg/ml; 2,11 mg/ml; 0,56 mg/ml e 0,40 mg/ml. Estes resultados sugerem interferência de raça na variável estudada.

Sabe-se que a lactoferrina possui comprovada função protetora na glândula mamária durante o período seco (NONNECKE e SMITH, 1984) e, possivelmente, no trato gastrintestinal do recém-nascido. NONNECKE e SMITH (1984) e CARLSSON et al. (1989), respectivamente, constataram que a lactoferrina é capaz de inibir o crescimento de *E. coli* e *Bacillus stearothermophilus*.

## **CAPÍTULO 1**

### **CONCENTRAÇÕES DE IgG EM COLOSTROS DE VACAS MISTIÇAS HOLANDÊS-ZEBU**

#### **1. INTRODUÇÃO**

Os níveis séricos de imunoglobulinas necessários para conferir proteção a bezerros recém-nascidos são influenciados por determinados fatores ambientais e pela carga de patógenos à qual os animais são expostos (HOPKINS et al., 1984; GARRY et al., 1993). No entanto, há um consenso de que, em bezerros com 24 horas de idade, concentrações mínimas de imunoglobulinas G (IgG) séricas equivalentes a 10 mg/ml são suficientes para minimizar riscos de doenças infecciosas na maioria dos ambientes onde esses animais são criados (A GUIDE TO COLOSTRUM AND MANAGEMENT ... , 1998). TYLER et al. (1996), por outro lado, admitem que concentrações séricas mais elevadas talvez sejam requeridas por animais criados em más condições de higiene e que, em situações radicalmente opostas, concentrações inferiores às referidas acima também poderiam ser suficientes.

Para que esses neonatos possam alcançar níveis séricos de anticorpos considerados adequados, cerca de 80 a 100 g de imunoglobulinas deverão ser ingeridas através do colostro logo após o parto (RADOSTITS et al., 1994). Sob

esse aspecto, tem sido recomendado que bezerros recém-nascidos devem receber, no seu primeiro dia de vida, um volume de colostro correspondente a 10 % do seu peso, sendo metade fornecida dentro das primeiras seis horas pós-parto e o restante até doze horas (PARISH, 1996). Aqueles pertencentes a raças leiteiras de maior porte devem ingerir, no mínimo, quatro litros de colostro (GAY e BESSER, 1991; MORIN et al., 1997).

Para estabelecimento das práticas referidas acima, pesquisadores procuraram conhecer as concentrações de imunoglobulinas do colostro, mas a grande maioria dos estudos foi feita em rebanhos constituídos por animais da raça holandesa. A partir do momento em que foram encontradas diferenças nas concentrações de imunoglobulinas colostrais em outros rebanhos (QUIGLEY et al., 1994; PERINO, 1997; TYLER et al., 1999), surgiram questionamentos sobre essas recomendações (TYLER et al., 1999), ou até mesmo foram introduzidas modificações envolvendo práticas de fornecimento de colostro (BRENNER et al., 1992; QUIGLEY et al., 1995a). De fato, a concentração de imunoglobulinas no colostro é o mais importante fator a se considerar, quando se decide qual volume o animal deve mamar, pois o que se está procurando com as práticas usuais referidas é a administração de imunoglobulinas e não de colostro *per se*. Obviamente, se a concentração de imunoglobulinas for baixa, maior volume de colostro será necessário (QUIGLEY, 1997).

No Brasil, as recomendações envolvendo fornecimento de colostro a bezerros, objetivando transferência de imunidade passiva, têm seguido as mesmas preconizadas para rebanhos norte-americanos que, em sua maioria, são constituídos por animais da raça holandesa. Entretanto, não há um conhecimento satisfatório envolvendo concentrações de imunoglobulinas colostrais em vacas mestiças holandês-zebu de diferentes graus de sangue, que são predominantes nos nossos rebanhos leiteiros. Acredita-se que informações dessa natureza, geradas por essa pesquisa, permitirão ajustar a implementação de práticas relacionadas ao fornecimento de colostro a bezerros neonatos criados na maioria das nossas condições.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Na presente pesquisa, foram utilizadas seis fazendas de criação de bovinos leiteiros mestiços holandês-zebu das microrregiões de Ponte Nova e Viçosa, Minas Gerais, selecionadas entre aquelas onde foram mantidas produções superiores a 500 litros diários ao longo do ano ou, pelo menos, durante a maioria dos meses. A produção média diária de leite por vaca, nos diversos rebanhos considerados, situava-se entre 12 e 15 litros e, em termos de volume de colostro obtido na primeira ordenha, valores entre 0,5 a 5 litros foram observados.

As propriedades eram assistidas por técnicos ligados à bovinocultura leiteira e adotavam práticas de manejo e de gerenciamento condizentes com níveis satisfatórios de tecnificação para a atividade, tais como: inseminação artificial em 100% dos animais em reprodução, ordenha mecânica, tanques resfriadores para leite, alimentação volumosa à base de pastagens de gramíneas e silagem de milho, capim verde picado e/ou cana com uréia, fornecimento de concentrados conforme recomendações técnicas, e emprego de práticas sanitárias mínimas necessárias para garantir a hígidez dos rebanhos. Todas elas foram consideradas homogêneas e não apresentavam quaisquer características capazes de influenciar as variáveis estudadas.

Entre junho e setembro de 1999, foram colhidas 88 amostras de colostros obtidas na primeira ordenha pós-parto de vacas híbridas e sem histórico de mastites ou qualquer afecção que pudesse interferir na composição da referida secreção. Para isto, foram utilizados frascos plásticos individuais que, em seguida, foram congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  nas próprias fazendas ou no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Posteriormente, esse material foi descongelado, aliquotado em criotubos de 3 ml e novamente congelado até o momento de ser processado em laboratórios da Instituição.

Além do material já referido, foram colhidas também informações a respeito do grau de sangue holandês-zebu (HZ) dos animais utilizados na pesquisa, o que permitiu distribuí-los em quatro grupos de graus de sangue: Grupo 1 = menos de 70% de grau de sangue holandês (19 vacas); Grupo 2 = animais  $\frac{3}{4}$  HZ (46 vacas); Grupo 3 = mestiços entre 80 e 90 % de grau de sangue holandês, que corresponderam a  $\frac{13}{16}$  HZ e  $\frac{7}{8}$  HZ (11 vacas); Grupo 4 = vacas com mais de 90% de grau de sangue holandês (12 animais).

## 2.1. Concentração de IgG

A produção de anticorpos anti-IgG foi feita em coelhos de acordo com o seguinte protocolo:

- i. os animais foram inoculados por via subcutânea a intervalos quinzenais, sendo que na primeira inoculação cada um recebeu 1 mg de IgG bovina<sup>1</sup> em 800  $\mu\text{l}$  de solução constituída de volumes iguais de salina (0,9% NaCl v/v em água destilada) e adjuvante completo de Freund<sup>2</sup>.
- ii. na segunda inoculação, administraram-se 2 mg de IgG por animal em um volume de 400  $\mu\text{l}$  da mesma solução.
- iii. a terceira inoculação consistiu na administração de doses individuais de 1 mg de IgG por animal em 800  $\mu\text{l}$  de solução preparada com salina e adjuvante incompleto de Freund<sup>3</sup>, em partes equivalentes.

---

<sup>1</sup> IgG bovina – Sigma Chemical Co.

<sup>2</sup> Adjuvante Completo de Freund – Sigma Chemical Co.

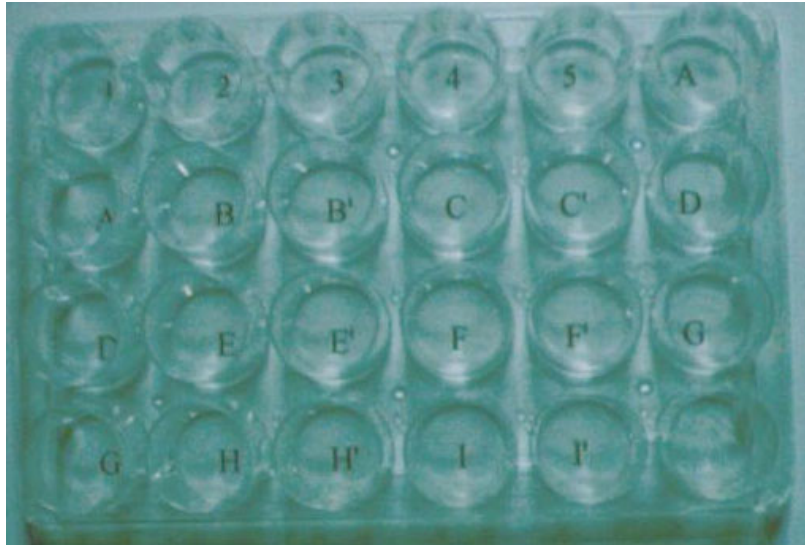
<sup>3</sup> Adjuvante Incompleto de Freund – Sigma Chemical Co.

- iv. quinze dias após a terceira inoculação, realizou-se a primeira sangria de prova. Para a titulação do soro foi empregada a técnica de imunodifusão dupla conforme JOHNSON (1986).
- v. em seqüência foi feita uma inoculação de reforço, repetindo-se o mesmo procedimento do item iii acima.
- vi. nova sangria de prova e titulação foram realizadas quinze dias após a inoculação de reforço e, como os títulos de anticorpos anti-IgG permaneceram inalterados, os coelhos foram sacrificados para obtenção do soro hiperimune.
- vii. a purificação dos anticorpos anti-IgG bovina foi feita conforme McKENNEY e PARKINSON (1987) e a determinação de proteínas na solução estoque de anticorpos foi feita pelo método de LOWRY et al. (1951).

A concentração de IgG no colostro foi determinada através da técnica de imunodifusão radial simples segundo JOHNSON (1986), com modificações. No caso, o ágar de trabalho era preparado imediatamente antes do uso, diluindo-se a 1:100 a solução estoque de anticorpos anti-IgG bovina (28 mg de proteína/ ml) com outra de agarose a 1% em tampão PBS pH 7. A seguir, placas de poliestireno<sup>4</sup> eram previamente aquecidas a 52°C e, então, volumes de 354 µl de ágar eram transferidos para 23 das 24 escavações de cada placa, o que permitia a formação de camadas com espessura uniforme em todas elas. Após solidificação à temperatura ambiente, orifícios de 2,5 mm de diâmetro eram feitos no centro das camadas de gel contidas nas escavações, e cada um deles preenchido com volumes de 5 µl durante as provas de imunodifusão radial simples (Figura 1). Assim, cada placa recebia cinco soluções de concentrações conhecidas de IgG, destinadas a se construir uma curva padrão, além de duplicatas de seis amostras de colostro diluídas a 1:200 em tampão PBS pH 7. As amostras cujas repetições apresentavam leituras com variação superior a 10% em torno da média eram novamente submetidas à imunodifusão.

---

<sup>4</sup> Placas para cultivo celular – Corning Glass Workers, EUA.



A



B

Figura 1– Fotografias representativas do uso de placas de cultivo celular de 24 escavações para imunodifusão radial simples. A - Esquema de distribuição de padrões e amostras utilizado na imunodifusão radial simples. Números indicam escavações destinadas aos padrões, letras indicam escavações destinadas às amostras, letras iguais com apóstrofo indicam duplicatas. B - Placa de cultivo celular com gel de trabalho pronta para receber padrões e amostras.

## 2.2. Análises dos Dados

Para estudar o efeito do grau de sangue sobre a concentração de IgG foi proposto o modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + g_i + e_{ij}, \text{ em que}$$

$Y_{ij}$  = valor observado no grau de sangue  $i$ ; e no animal  $j$  ( $i = 1, 2, 3$  e  $4$ );

$\mu$  = constante inerente a todas as observações;

$g_i$  = efeito do grau de sangue  $i$ ; e

$e_{ij}$  = erro experimental associado à observação  $Y_{ij}$ .

Os resultados das concentrações de IgG foram submetidos à análise de variância, com a aplicação do teste F, a 5% de probabilidade, para comparação das médias dos diferentes grupos de graus de sangue, utilizando-se o programa estatístico SAEG 8.0. Também, dentro do contexto da análise de variância, foi construído um intervalo de confiança para a média com nível de confiança de 95%, dado por:

$$IC (\mu)_{0,95} = \mu \pm t_{0,05/2} * \sqrt{QMRes/n}, \text{ em que:}$$

$\mu$  = média geral do experimento;

$t_{0,05/2}$  = valor tabelado de  $t$ , a 5% de probabilidade, com  $n'$  graus de liberdade do resíduo;

$QMRes$  = quadrado médio do resíduo da análise de variância; e

$n$  = número total de vacas analisadas



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que os diversos agrupamentos de graus de sangue não apresentaram diferenças ( $P > 0,05$ ) com relação às médias de IgG (Tabela 1 e Tabela 2), apesar de vários autores (KRUSE, 1970; MULLER e ELLINGER, 1981; NORMAN et al., 1981; PRITCHETT et al., 1991; BESSER e GAY, 1994; QUIGLEY et al., 1994; VANN et al., 1995; LEVIEUX e OLLIER, 1999; TYLER et al., 1999) terem relatado diferenças envolvendo concentrações de imunoglobulinas colostrais entre raças taurinas puras.

Tabela 1 – Resumo da análise de variância do modelo estatístico proposto para estudar o efeito de grau de sangue sobre a concentração de IgG no colostro de vacas mestiças holandês-zebu

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Significância
Grau de Sangue	3	7073,036	2357,679	0,737	**
Resíduo	84	268609,800	3197,735		

\*\* Não-significativo

Tabela 2 – Concentrações de IgG no colostro de vacas mestiças holandês-zebu, das microrregiões de Ponte Nova e Viçosa, de acordo com o agrupamento de graus de sangue holandês

Graus de sangue	IgG (mg/ml)*
< 70% holandês	139,90
75% holandês	150,86
80 a 90 % holandês	126,12
> 90 % holandês	154,83
Média	145,94
CV(%)	38,75

\*As médias dos diferentes grupos de graus de sangue não diferem entre si ( $P > 0,05$ ) pelo teste F.

De acordo com BESSER e GAY (1994); A GUIDE TO COLOSTRUM AND MANAGEMENT ... (1998) e TYLER et al. (1999), vacas puras da raça holandesa apresentam menores concentrações de IgG em seus colostros, quando comparadas a outras das raças guernsey, jersey e pardo suíço. Portanto, esperava-se que vacas mestiças, com maior grau de sangue holandês, tais como aquelas dos grupos 3 e 4, apresentassem menores concentrações de IgG no colostro do que as demais. No entanto, os resultados aqui expostos sugerem que, em vacas mestiças HZ, o grau de sangue holandês não afeta os níveis de IgG colostrais. Talvez isso possa ser atribuído ao cruzamento com raças zebuínas que, supostamente, devem exibir níveis de imunoglobulinas colostrais similares a raças taurinas de corte. De fato, sabe-se que essas se caracterizam, de um modo geral, por apresentarem níveis mais elevados de IgG em seus colostros do que raças leiteiras (BESSER e GAY, 1994; GUY et al., 1994). Essas diferenças são impostas, principalmente, pelo volume de colostro produzido e pela capacidade seletiva das células do epitélio secretor no transporte de IgG do sangue para o colostro (PRITCHETT et al., 1991; GUY et al., 1994).

Segundo BESSER e GAY (1993), QUIGLEY (1997) e RADOSTITS et al. (2000), produções acima de 8 a 9 kg de colostro correlacionam-se com baixos níveis de anticorpos naquela secreção. Muito embora não tenham sido medidos, precisamente, os volumes de colostro obtidos dos diversos animais utilizados nessa pesquisa, pode-se assegurar que eles não atingiram valores considerados de risco para promover uma maior diluição das imunoglobulinas. Ademais, os níveis médios de produção diária de leite por vaca, observados nos diversos rebanhos considerados, corroboram essa afirmativa.

Reconhecidamente, a carga e a diversidade de agentes infecciosos presentes nos diversos ambientes onde os animais são criados contribuem para estimular a produção de imunoglobulinas colostrais (A GUIDE TO COLOSTRUM ..., 1998). Na maioria das propriedades leiteiras nacionais, são encontradas características que permitem supor essa condição, porquanto os ambientes não foram projetados e tampouco recebem cuidados adequados para se reduzirem desafios impostos pela carga de patógenos do meio. Obviamente, as propriedades onde essa pesquisa foi conduzida não são exceção ao que acaba de ser considerado.

O resultado de não significância do teste F para as médias encontradas em todos os grupos de graus de sangue permite que se considere o valor de 145,94 mg de IgG/ml de colostro como estimativa da média para vacas mestiças HZ. Considerando-se que a característica mostrou-se bastante instável ( $CV > 30\%$ ), e, portanto, sua média pouco representativa, foi estabelecido um intervalo de confiança para a média, com 95% de nível de confiança, cujos limites variaram entre 134,00 a 157,88 mg/ml.

No colostro de vacas holandesas, MULLER e ELLINGER (1981) encontraram concentrações médias de IgG de 41,20 mg/ml, PRITCHETT et al. (1991) de 48,20 mg/ml e LEVIEUX e OLLIER (1999) de 59,80 mg/ml. Em vacas jersey, MULLER e ELLINGER (1981) e QUIGLEY et al. (1994) relataram valores da ordem de 66 mg/ml, enquanto na raça guernsey foram descritos 50,02 mg/ml (MULLER e ELLINGER, 1981) e 115,67 mg/ml (TYLER et al., 1999). Comparando-se esses valores com aqueles obtidos nesta pesquisa,

constata-se que o valor inferior do intervalo de confiança corrobora a afirmação de valores de IgG colostrais altos para vacas mestiças HZ.

Há de ser considerado que, muito embora não tenha sido demonstrado para raças leiteiras, vacas de corte mestiças apresentaram níveis de anticorpos colostrais superiores àqueles encontrados nas puras que deram origem ao cruzamento (McGray, 1979 *apud* BESSER e GAY, 1994; NORMAN et al., 1981). Deve-se ressaltar que no caso de zebuínos e mestiços holandês-zebu, entretanto, a literatura não registra informações a respeito, mas o mesmo fenômeno poderia ocorrer.

Por fim, cabe aqui salientar que essa grande amplitude do intervalo de confiança se torna menos importante, já que médias acima de 50 mg/ml são preconizadas para atendimento às exigências de transferência de imunidade passiva (GAY e BESSER, 1991). Além disso, os níveis de IgG colostrais encontrados, comparativamente maiores que os descritos por autores europeus e norte-americanos em raças leiteiras taurinas puras (PENHALE e CHRISTIE, 1969; KRUSE, 1970; OYENIYI e HUNTER, 1978; MULLER e ELLINGER, 1981; PRITCHETT et al., 1991; QUIGLEY et al., 1994; TYLER et al., 1999; LEVIEUX e OLLIER, 1999), impõem uma reflexão sobre o conceito de que 4 litros de colostro deveriam ser oferecidos para bezerros neonatos mestiços holandês-zebu, nas primeiras 24 horas de vida, com fins de transferência de imunidade passiva. Sabendo-se que um animal desses deve ingerir de 80 a 100 g de imunoglobulinas colostrais (RADOSTITS et al., 1994), bastaria a ingestão de um volume inferior a 1 litro para atendimento a essa recomendação. Com efeito, BRENNER et al. (1992) adotaram como prática o fornecimento de apenas 1,5 litro de colostro para fins de transferência de imunidade passiva em rebanhos que apresentaram níveis de IgG colostrais próximos àqueles aqui encontrados. Considerações semelhantes a respeito de reduções de volumes de colostro a ser administrado a neonatos pertencentes a raças que apresentaram concentrações de imunoglobulinas mais altas foram feitas também por TYLER et al. (1999).

Em decorrência dos altos níveis de imunoglobulinas encontrados nas amostras de colostro analisadas, é provável que, se bezerros mestiços holandês-

zebu conseguirem ingerir um pouco de colostro, antes que cesse o mecanismo de pinocitose através da mucosa intestinal, na maioria das vezes não terão problemas com relação à transferência de imunidade passiva. Seria, pois, remota, a probabilidade de que um volume de colostro procedente de animais hígdos e que tivessem um período seco não muito reduzido viesse a fornecer uma massa de imunoglobulinas aquém do recomendável para fins de imunidade neonatal.

Segundo PARISH (1996), em rebanhos leiteiros, a percentagem de bezerros com falha de transferência de imunidade passiva situa-se entre 15 e 68%, sendo as principais causas a demora na primeira ingestão de colostro, as pequenas quantidades de colostro ingeridas e as baixas concentrações de imunoglobulinas colostrais. Em função das altas concentrações de imunoglobulinas colostrais encontradas, acredita-se que, na maioria das vezes, apenas o primeiro fator relacionado acima poderia ser responsabilizado por esse tipo de problema em bezerros mestiços holandês-zebu.

A maioria das propriedades leiteiras nacionais recorre à mamada natural não assistida para fornecimento do colostro. Sabidamente, no caso de rebanhos holandeses, essa prática é a que mais está associada à hipogamaglobulinemia em bezerros (BESSER et al., 1991), mas nas raças de corte a transferência de imunoglobulinas é conseguida de maneira bastante satisfatória exatamente com a mamada natural. Isso pode ser explicado pelo fato de que bezerros recém-nascidos são mais vigorosos, e as concentrações de imunoglobulinas colostrais bem mais altas, possibilitando, assim, que a ingestão de volumes menores de colostros forneçam massas adequadas de imunoglobulinas requeridas para a transferência de imunidade passiva (RADOSTITS et al., 2000). A rigor, o mesmo deve ocorrer com animais mestiços holandês-zebu criados em nosso país. Portanto, é provável que na maioria das vezes não se justifique o emprego de métodos artificiais de fornecimento do colostro, em se tratando de mestiços holandês-zebu. No máximo, bastaria recorrer à mamada natural assistida, para que esses bezerros alcançassem níveis adequados de gamaglobulinemia no período neonatal.

Diante das altas concentrações de imunoglobulinas encontradas em praticamente todas as amostras analisadas, também não se justifica a avaliação da densidade do colostro através de colostrômetros, em se tratando de vacas mestiças holandês-zebu. Afinal, esse recurso se presta muito mais para evitar que se utilize um colostro de má qualidade do que para selecionar outros pelos teores de imunoglobulinas (GAY e BESSER, 1991).

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Oitenta e oito vacas mestiças holandês-zebu, híbridas e com previsão de parto dentro do período compreendido entre junho e setembro de 1999, foram distribuídas de acordo com o grau de sangue holandês, em quatro grupos: Grupo 1 = menos de 70% de grau de sangue holandês (19 vacas); Grupo 2 = animais  $\frac{3}{4}$  HZ (46 vacas); Grupo 3 = mestiços entre 80 e 90 % de grau de sangue holandês, que corresponderam a  $\frac{13}{16}$  HZ e  $\frac{7}{8}$  HZ (11 vacas); Grupo 4 = vacas com mais de 90% de grau de sangue holandês (12 animais). Após o parto, amostras representativas de colostro da primeira ordenha foram obtidas de todas elas e, posteriormente, submetidas a determinações dos níveis de IgG empregando-se a técnica de imunodifusão radial simples. Os resultados obtidos, nas condições desta pesquisa, permitiram as seguintes conclusões:

1. As concentrações de IgG colostrais não são influenciadas pelo grau de sangue.
2. Os valores médios de IgG colostrais, em vacas HZ, são bastante superiores aos relatados para animais de raças taurinas puras.
3. A grande amplitude do intervalo de confiança para a média de IgG não desqualifica o colostro de animais mestiços HZ, já que o seu limite inferior é bastante elevado.
4. Não se justifica o emprego de métodos artificiais de fornecimento do colostro e tampouco uma avaliação prévia de densidade da referida secreção, no caso de mestiços holandês-zebu.

5. O nível elevado de IgG observado no colostro sugere que a adoção da prática da mamada natural assistida seja adequada para assegurar que não haja falha de transferência de imunidade passiva.



## **CAPÍTULO 2**

### **NÍVEIS DE INIBIDORES DE TRIPSINA E LACTOFERRINA EM COLOSTROS DE VACAS MISTIÇAS HOLANDÊS-ZEBU**

#### **1. INTRODUÇÃO**

As imunoglobulinas colostrais são importantes para redução das taxas de morbidade e mortalidade de bezerros e para a melhoria dos índices de desempenho desses animais (SELIM et al., 1995; PERINO et al., 1995; DONOVAN et al., 1998). Daí elas serem consideradas os principais fatores de proteção transferidos pelo colostro (REITER, 1978). Entretanto, quando o bezerro mama o colostro, outros constituintes como células, fatores antimicrobianos inespecíficos e inibidores de tripsina são também ingeridos e desempenham importantes funções, na medida em que favorecem a absorção ou potencializam a ação das imunoglobulinas e modulam a resposta imune no recém-nascido.

Colostros de vacas, porcas e outras espécies nas quais não ocorre passagem de macromoléculas através da placenta encerram elevadas concentrações de substâncias de natureza proteica, sem funções imunológicas, que são capazes de inibir a tripsina e, indiretamente, favorecer a absorção de algumas proteínas pelo neonato (LASKOWSKI e LASKOWSKI, 1951;

PEDERSEN et al., 1971; PIÑEIRO et al., 1978; JENSEN, 1978; BAINNER e CSAPÓ, 1996). Desse modo, constituintes colostrais como IgG, lactoferrina e complemento, que sofrem maior ataque proteolítico por parte da tripsina, seriam favorecidos, em relação à sua integridade no intestino do neonato. A IgM, por outro lado, não teria esse favorecimento, porque ela sofre maior digestão por parte da quimotripsina, enzima que praticamente não é inibida pela referida substância (BROCK et al., 1977a, 1977b e 1978). De acordo com Hardy (1969) *apud* QUIGLEY et al. (1995c), na ausência dessa inibição, poderá haver digestão de imunoglobulinas colostrais e, desse modo, ocorrer elevação de casos de falha de transferência de imunidade passiva, principalmente quando se retarda a administração do colostro.

Em relação aos fatores antimicrobianos inespecíficos presentes no colostro, a lactoferrina é o principal deles e, inclusive, seus níveis são muito superiores àqueles encontrados no leite. Ela é produzida pelo epitélio secretor da glândula mamária e suas concentrações máximas são atingidas na metade do período seco (SANCHEZ et al., 1992; HURLEY et al., 1993), época em que ela tem importante função protetora (NONNECKE e SMITH, 1984).

É possível que a lactoferrina seja capaz de agir como sinergista das imunoglobulinas e conferir alguma proteção ao neonato, durante o período compreendido entre a ingestão do colostro e o momento a partir do qual os anticorpos colostrais passam a atuar efetivamente no organismo (REITER, 1978). Na medida em que ela é capaz de inibir o crescimento de bactérias enteropatogênicas (REITER et al., 1975; NONNECK e SMITH, 1984) e *Bacillus stearothermophilus* (CARLSSON et al., 1989) “in vitro”, acredita-se também que ela possa exercer um papel semelhante a nível do trato gastrointestinal do recém-nascido. Ademais, LEE et al. (1998) demonstraram que ela tem efeito protetor contra endotoxinas de bactérias Gram-negativas.

Deve-se chamar a atenção para o fato de que os rebanhos leiteiros nacionais contêm, predominantemente, vacas mestiças holandês-zebu, das quais muito pouco se conhece sobre as variações de seus constituintes colostrais de importância na imunidade neonatal. Em função disso, foi conduzida esta

pesquisa , cujos objetivos consistiram em conhecer os níveis de inibidores de tripsina e lactoferrina encontrados em colostros de vacas mestiças holandês-zebu criadas em nosso meio.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Na presente pesquisa, foram utilizadas seis fazendas de criação de bovinos leiteiros mestiços holandês-zebu das microrregiões de Ponte Nova e Viçosa, Minas Gerais, selecionadas entre aquelas onde foram mantidas produções superiores a 500 litros diários ao longo do ano ou, pelo menos, durante a maioria dos meses. A produção média diária de leite por vaca, nos diversos rebanhos considerados, situava-se entre 12 e 15 litros e, em termos de volume de colostro obtido na primeira ordenha, valores entre 0,5 a 5 litros foram observados.

As propriedades eram assistidas por técnicos ligados à bovinocultura leiteira e adotavam práticas de manejo e de gerenciamento condizentes com níveis satisfatórios de tecnificação para a atividade, tais como: inseminação artificial em 100% dos animais em reprodução, ordenha mecânica, tanques resfriadores para leite, alimentação volumosa à base de pastagens de gramíneas e silagem de milho, capim verde picado e, ou, cana com uréia, fornecimento de concentrados conforme recomendações técnicas, e emprego de práticas sanitárias mínimas necessárias para garantir a hígidez dos rebanhos. Todas elas foram consideradas homogêneas e não apresentavam quaisquer características capazes de influenciar as variáveis estudadas.

Entre junho e setembro de 1999, foram colhidas 88 amostras de colostros obtidas na primeira ordenha pós-parto de vacas híbridas e sem histórico de mastites ou qualquer afecção que pudesse interferir na composição da referida secreção. Para isto, foram utilizados frascos plásticos individuais que, em seguida, foram congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  nas próprias fazendas ou no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Posteriormente, esse material foi descongelado, aliquotado em criotubos de 3 ml e novamente congelado até o momento de ser processado em laboratórios da Instituição.

Além do material já referido, foram colhidas também informações a respeito do grau de sangue holandês-zebu (HZ) dos animais utilizados na pesquisa, o que permitiu distribuí-los em quatro grupos de graus de sangue: Grupo 1 = menos de 70% de grau de sangue holandês (19 vacas); Grupo 2 = animais  $\frac{3}{4}$  HZ (46 vacas); Grupo 3 = mestiços entre 80 e 90 % de grau de sangue holandês, que corresponderam a  $\frac{13}{16}$  HZ e  $\frac{7}{8}$  HZ (11 vacas); Grupo 4 = vacas com mais de 90% de grau de sangue holandês (12 animais).

## **2.1. Inibidores de tripsina**

Inicialmente, uma alíquota de colostro foi descongelada à temperatura ambiente e dela retirado 0,5 ml que, então, foi diluído em 4,5 ml de água deionizada. A solução formada foi homogeneizada e, em seguida, centrifugada à temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, a 9.500 g, para extração dos inibidores presentes. Ao final desse processo, 200  $\mu\text{l}$  do sobrenadante foram utilizados para as determinações dos níveis de inibidores de tripsina empregando-se N-benzoil-D,L-arginina-p-nitroanilina (D,L-BApNA) como substrato (ERLANGER et al., 1961), segundo detalhamento apresentado na Figura 1. Utilizou-se 0,019 como fator de tripsina, que representa a absorvância do produto da atuação de 1  $\mu\text{g}$  de tripsina ativa sobre o substrato D,L-BApNA, a um comprimento de onda de 410 nm (KAKADE et al., 1969). Os resultados foram expressos em mg de tripsina inibida por ml de colostro.

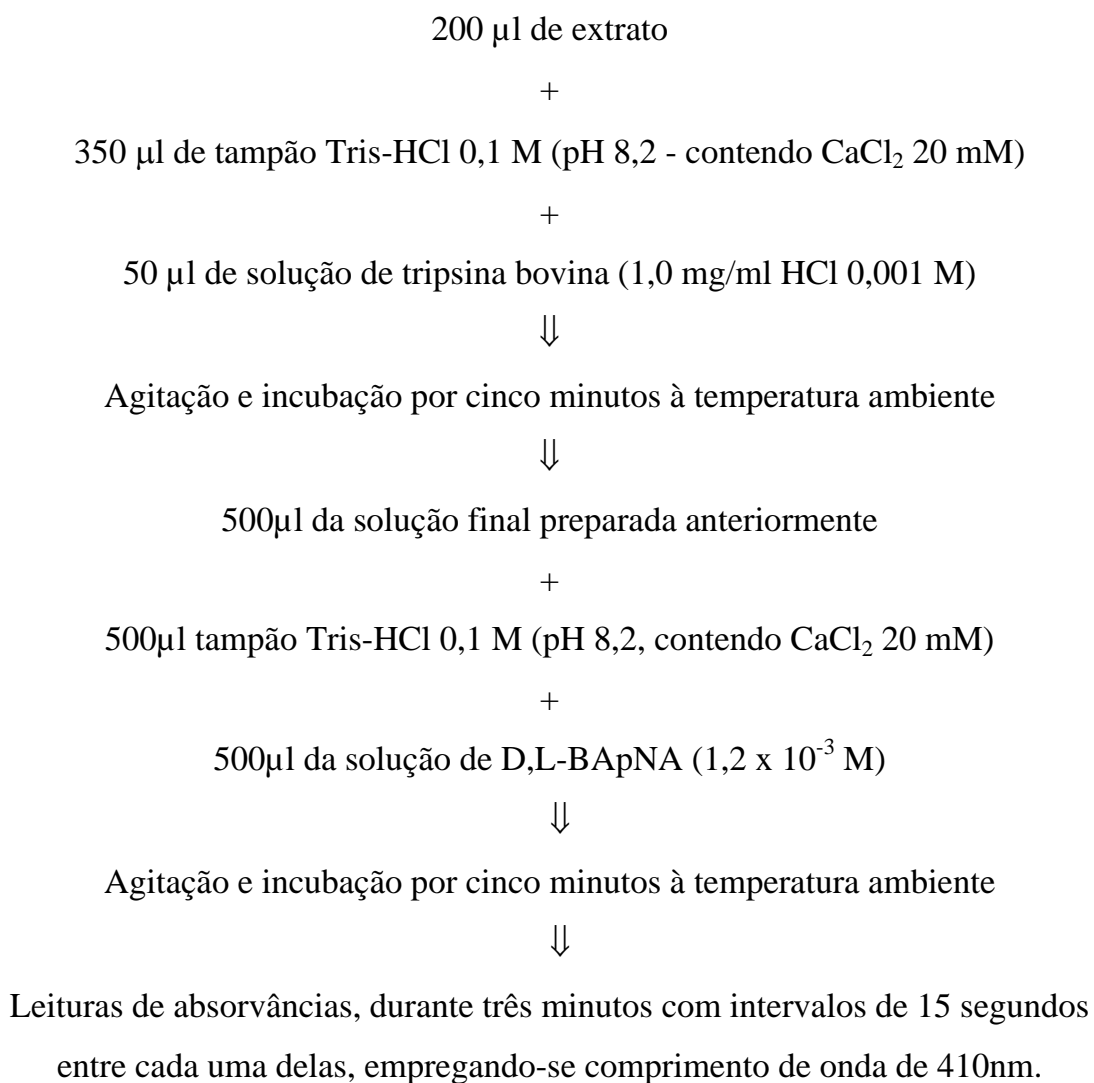


Figura 1 – Fluxograma de determinação da atividade de tripsina na presença ou na ausência de inibidores.

## 2.2. Lactoferrina

A produção de anticorpos anti-lactoferrina foi feita em coelhos de acordo com o seguinte protocolo:

- i. os animais foram inoculados por via subcutânea a intervalos quinzenais, sendo que na primeira inoculação cada um recebeu 0,5 mg de lactoferrina<sup>1</sup> em 800 µl de solução constituída de volumes iguais de salina (0,9% NaCl v/v em água destilada) e adjuvante completo de Freund<sup>2</sup>.
- ii. na segunda inoculação, administrou-se 1 mg de lactoferrina por animal em um volume de 500 µl da mesma solução.
- iii. a terceira inoculação consistiu da administração de doses individuais de 0,5 mg de lactoferrina em 800 µl de solução preparada com salina e adjuvante incompleto de Freund<sup>3</sup>, em partes equivalentes.
- iv. quinze dias após a terceira inoculação, realizou-se uma primeira sangria de prova. Para a titulação, foi empregada a técnica de imunodifusão dupla conforme JOHNSON (1986).
- v. em seqüência, foram feitas duas inoculações de reforço procedendo-se da mesma maneira descrita no ítem iii acima.
- vi. novas sangrias de prova e titulações foram realizadas quinze dias após cada uma das doses de reforço e, como os títulos de anticorpos anti-lactoferrina permaneceram inalterados, os coelhos foram sacrificados para obtenção do soro hiperimune.
- vii. a purificação dos anticorpos anti-lactoferrina foi feita segundo McKENNEY e PARKINSON (1987), e a determinação das proteínas na solução estoque de anticorpos foi feita pelo método de LOWRY et al. (1951).

A concentração de lactoferrina no colostro foi determinada através da técnica de imunodifusão radial simples segundo JOHNSON (1986), com

---

<sup>1</sup> Lactoferrina do colostro bovino - Sigma Chemical Co.

<sup>2</sup> Adjuvante Completo de Freund – Sigma Chemical Co.

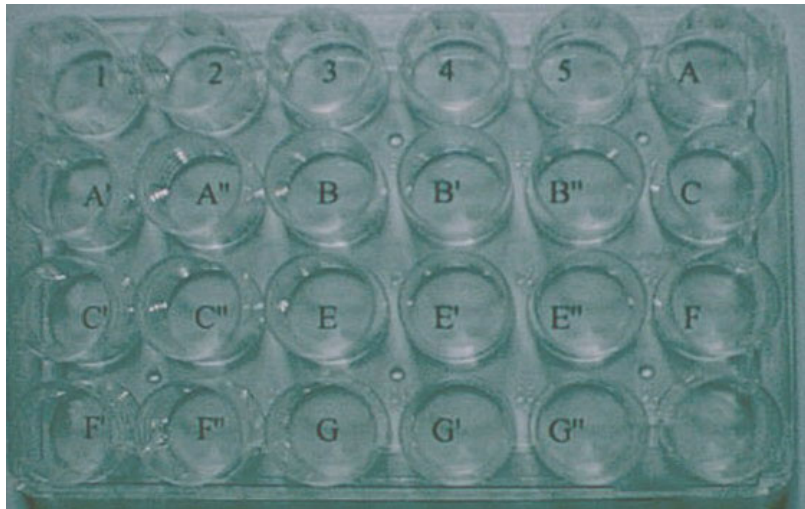
<sup>3</sup> Adjuvante Incompleto de Freund – Sigma Chemical Co.

modificações. No caso, o ágar de trabalho era preparado imediatamente antes do uso, diluindo-se a 1:200 a solução estoque de anticorpos anti-lactoferrina (12 mg de proteína por ml) com outra de agarose a 1% em tampão PBS pH 7. A seguir, placas de poliestireno<sup>4</sup> eram previamente aquecidas a 52°C e, então, volumes de 354 µl de ágar eram transferidos para 23 das 24 escavações de cada placa, o que permitia a formação de camadas com espessura uniforme em todas elas. Após solidificação à temperatura ambiente, orifícios de 2,5 mm de diâmetro eram feitos no centro das camadas de gel contidas nas escavações e cada um deles preenchido com volumes de 5 µl durante as provas de imunodifusão radial simples (Figura 2). Assim, cada placa recebia cinco soluções contendo concentrações conhecidas de lactoferrina, destinadas a se construir uma curva padrão, além de triplicatas de seis amostras de colostro diluídas a 1:2 em tampão PBS pH 7. As amostras, cujas repetições apresentavam leituras com variação superior a 10% em torno da média, eram novamente submetidas à imunodifusão.

---

<sup>4</sup> Placas para cultivo celular – Corning Glass Workers, EUA





A



B

Figura 2 – Fotografias representativas do uso de placas de cultivo celular de 24 escavações para imunodifusão radial simples. A - Esquema de distribuição de padrões e amostras utilizado na imunodifusão radial simples. Números indicam escavações destinadas aos padrões, letras indicam escavações destinadas às amostras, letras iguais com apóstrofo indicam triplicatas. B - Placa de cultivo celular com gel de trabalho pronta para receber padrões e amostras.

### 2.3. Análises dos Dados

Para estudar o efeito do grau de sangue sobre o nível de inibidores de tripsina e sobre a concentração de lactoferrina, foi proposto o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + g_i + e_{ij}, \text{ em que}$$

$Y_{ij}$  = valor observado no grau de sangue  $i$ ; e no animal  $j$  ( $i = 1, 2, 3$  e  $4$ );

$\mu$  = constante inerente a todas as observações;

$g_i$  = efeito do grau de sangue  $i$ ; e

$e_{ij}$  = erro experimental associado à observação  $Y_{ij}$ .

Os resultados dos níveis de inibidores de tripsina foram submetidos à análise de variância, com a aplicação do teste F, a 5% de probabilidade, para comparação das médias dos diferentes grupos de graus de sangue, utilizando-se do programa estatístico SAEG 8.0. Também, dentro do contexto da análise de variância, foi construído um intervalo de confiança para a média com nível de confiança de 95%, dado por:

$$IC (\mu)_{0,95} = \mu \pm t_{0,05/2} * \sqrt{QMRES / n}, \text{ em que:}$$

$\mu$  = média geral do experimento;

$t_{0,05/2}$  = valor tabelado de  $t$ , a 5% de probabilidade, com  $n'$  graus de liberdade do resíduo;

QMRes = quadrado médio do resíduo da análise de variância;

$n$  = número total de vacas analisadas

Os resultados das concentrações de lactoferrina foram também submetidos à análise de variância com a aplicação do teste F, e as médias dos diferentes graus de sangue comparadas duas a duas, pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade, utilizando-se do programa estatístico SAEG 8.0. Também dentro do contexto da análise de variância, foi construído um intervalo de confiança para a média de cada grupo de grau de sangue com nível de confiança de 95%, dado por:

$$IC (\mu_i)_{0,95} = \mu_i \pm t_{0,05/2} * \sqrt{QMRes / r_i}, \text{ em que:}$$

$\mu$  = média observada no grau de sangue i;

$t_{0,05/2}$  = valor tabelado de t, a 5% de probabilidade, com n' graus de liberdade do resíduo;

QMRes = quadrado médio do resíduo da análise de variância; e

$r_i$  = número de vacas analisadas no grau de sangue i.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram encontradas influências ( $P > 0,05$ ) dos grupos de graus de sangue sobre os níveis de inibidores de tripsina do colostro de vacas mestiças holandês-zebu (Tabela 1 e Tabela 2).

Tabela 1 – Resumo da análise de variância do modelo estatístico proposto para estudar o efeito de grau de sangue sobre os níveis de inibidores de tripsina no colostro de vacas mestiças holandês-zebu

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Significância
Grau de Sangue	3	0,6485956	0,2161985	1,375	0,25613
Resíduo	84	13,21044	0,1572671		

Tabela 2 – Níveis de inibidores de tripsina no colostro de vacas mestiças holandês-zebu das microrregiões de Ponte Nova e Viçosa

Graus de Sangue	Inibidor de Tripsina * (mg de tripsina inibida/ml de colostro)
< 70% holandês	0,8055
70 a 80% holandês	1,0050
80 a 90 % holandês	0,9264
> 90 % holandês	1,0468
Média	0,9577
CV (%)	41,41

\* As médias dos diferentes grupos de graus de sangue não diferem entre si ( $P > 0,05$ ) pelo teste F.

A origem dos inibidores de tripsina no colostro, e, até mesmo quais fatores fisiológicos poderiam estar relacionados às variações nos seus níveis, são desconhecidos. Não é registrado na literatura nenhum estudo comparando níveis de inibidores de tripsina entre vacas de diferentes raças ou mesmo entre animais mestiços. Mesmo assim, sabendo-se da função que tais inibidores desempenham e que as menores concentrações de imunoglobulinas colostrais são encontradas em vacas holandesas (GUY et al., 1994; BESSER e GAY, 1994), esperava-se que animais com maior grau de sangue holandês, tais como aqueles do Grupo 4, apresentassem níveis de inibidores de tripsina mais altos que os demais. O nível médio de inibidores de tripsina do colostro de vacas mestiças holandês-zebu, independentemente do grau de sangue, foi de 0,9577 mg de tripsina inibida/ ml de colostro, com um intervalo de confiança para a média, com 95% de nível de confiança variando de 0,8736 a 1,0418 mg de tripsina inibida/ ml de colostro.

Os níveis de inibidores de tripsina do colostro de vacas mestiças holandês-zebu foram bastante elevados, se comparados aos dados disponíveis na literatura. Assim, no soro de colostro, PIÑEIRO et al. (1978) referiram-se a 0,798 mg de tripsina inibida/ ml para animais da raça holandesa. No que diz respeito ao

colostro total, HONKANEN-BUZALSKI e SANDHOLM (1981) relataram valores da ordem de 0,5 mg/ml em vacas cujas raças não foram mencionadas, e QUIGLEY et al. (1995b) encontraram valores médios de 0,56 mg/ml para vacas da raça jersey. Todavia, essas informações permitem apenas comparações com os níveis encontrados, uma vez que não há valores de referência estabelecidos para este componente do colostro.

Em termos de transferência de imunidade passiva, o aparente nível mais elevado de inibidores de tripsina no colostro dessas vacas, como observado neste trabalho, não garante, necessariamente, maior proteção das imunoglobulinas colostrais contra a inativação proteolítica no trato gastrointestinal do neonato. Cabe ressaltar que não são conhecidos exatamente os níveis de atividade trípica em bezerros mestiços HZ e muito menos a capacidade de esses animais inativarem, em nível de trato gastrointestinal, componentes colostrais envolvidos na transferência de imunidade passiva.

É possível que fatores fisiológicos ou mesmo o efeito de raça possam explicar, ainda que parcialmente, a magnitude dos níveis encontrados. Porém, é importante salientar que HONKANEN-BUZALSKI e SANDHOLM (1981) e QUIGLEY et al. (1995b), ao invés da técnica aqui empregada, utilizaram a inibição da difusão enzimática para quantificar os níveis de inibidores. É possível que essa diferença de metodologia possa também ter tido alguma interferência, mas não há estudos comparando ambas as técnicas.

Com relação à lactoferrina, observou-se que colostros das vacas pertencentes aos grupos 3 e 4 apresentaram os maiores valores (Tabela 3 e Tabela 4). Há de se registrar que em vacas das raças holandesa, jersey e duas outras de corte taurinas, referidas como “japanese black” e “japanese brown”, TSUJI et al. (1990) encontraram, respectivamente, níveis correspondentes a  $1,96 \pm 0,27$  mg/ml;  $2,11 \pm 0,36$  mg/ml;  $0,56 \pm 0,31$  mg/ml e  $0,40 \pm 0,30$  mg/ml. A partir desses dados, eles postularam a interferência do componente racial nos níveis de lactoferrina do colostro, mas não estudaram o efeito de cruzamentos entre raças. A literatura, por sua vez, não registra informações envolvendo níveis de lactoferrina em raças zebuínas e tampouco em cruzamentos holandês-zebu,

fato esse que impossibilita uma melhor discussão dos resultados obtidos.

Tabela 3 – Resumo da análise de variância do modelo estatístico proposto para estudar o efeito de grau de sangue sobre a concentração de lactoferrina no colostro de vacas mestiças holandês-zebu

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Significância
Grau de Sangue	3	6,640267	2,213422	2,822	0,4375
Resíduo	84	65,89106	0,7844174		

Tabela 4 – Concentrações de lactoferrina no colostro de vacas mestiças holandês-zebu das microrregiões de Ponte Nova e Viçosa, e seus respectivos intervalos de confiança

Graus de Sangue	Lactoferrina (mg/ml)	IC( $\mu_i$ ) <sub>0,95</sub> *		
		Limite inferior	Limite superior	Amplitude
< 70% holandês	0,65 <sup>b</sup>	0,25	1,06	0,81
70 a 80% holandês	0,82 <sup>b</sup>	0,56	1,08	0,52
80 a 90% holandês	1,58 <sup>a</sup>	1,05	2,12	1,07
> 90 % holandês	0,96 <sup>ab</sup>	0,45	1,47	1,02
Média	0,90			
CV (%)	98,44			

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ( $P > 0,05$ ) pelo teste de Duncan.

\* Intervalo de confiança para a média de cada grupo de grau de sangue com nível de confiança de 95%.

Reforçando a tese de que raça seja uma fonte de variação capaz de interferir nas concentrações de lactoferrina do colostro, pode-se também citar REITER (1978) que reportou concentrações que variaram entre 2 e 5 mg/ml. Já NONNECKE e SMITH (1984) relataram o valor de 1,82 mg/ml em vacas da raça holandesa, embora os dados sejam referentes a soro de colostro, e SANCHEZ et al. (1988) relataram um valor médio de 0,83 mg/ml. No primeiro e no segundo trabalhos os autores não informaram a raça dos animais.

Chama atenção a instabilidade dos níveis colostrais de lactoferrina (CV = 98,44%), fato também evidenciado por TSUJI et al. (1990). Esta instabilidade acarretou grandes amplitudes para os intervalos de confiança considerados, o que significou uma estimativa menos precisa da verdadeira média de cada grupo de grau de sangue. Fato interessante aconteceu com o grupo 4, que pode apresentar média em mg/ml de lactoferrina igual à de todos os outros grupos. Portanto, para raças mestiças holandês-zebu, apesar da tendência observada dos níveis de lactoferrina serem maiores nos grupos com maior grau de sangue holandês, é necessário sempre que desejado, medir os seus níveis nos colostros das vacas a serem estudadas.



#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Oitenta e oito vacas mestiças holandês-zebu, híbridas e com previsão de parto dentro do período compreendido entre junho e setembro de 1999, foram distribuídas de acordo com o grau de sangue holandês em quatro grupos conforme segue: Grupo 1 = menos de 70% de grau de sangue holandês (19 vacas); Grupo 2 = animais  $\frac{3}{4}$  HZ (46 vacas); Grupo 3 = mestiços entre 80 e 90 % de grau de sangue holandês, que corresponderam a  $\frac{13}{16}$  HZ e  $\frac{7}{8}$  HZ (11 vacas); Grupo 4 = vacas com mais de 90% de grau de sangue holandês (12 animais). Após o parto, amostras representativas de colostro da primeira ordenha foram obtidas de todas elas e, posteriormente, submetidas a determinações dos níveis de inibidores de tripsina e das concentrações de lactoferrina. No primeiro caso, foi empregada técnica colorimétrica tendo-se como substrato D,L-BAPNA e, no segundo, imunodifusão radial simples. Os níveis médios de inibidores de tripsina encontrados no colostro foram de 0,9577 mg de tripsina inibida/ml. Os demais resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

1. O grau de sangue não influencia os níveis de inibidores de tripsina do colostro, mas influencia as concentrações de lactoferrina.
2. Os níveis médios de inibidores de tripsina, em colostros de vacas mestiças holandês-zebu, equiparam-se ou até mesmo superam os valores descritos para raças taurinas leiteiras.

3. A alta variabilidade dos níveis de lactoferrina dos grupos estudados impossibilita a obtenção de uma estimativa da média representativa desta variável.

## RESUMO E CONCLUSÕES

Essa pesquisa foi conduzida em seis fazendas de criação de bovinos leiteiros mestiços holandês-zebu, de diferentes graus de sangue, localizadas nas microrregiões de Ponte Nova e Viçosa, Minas Gerais. As propriedades foram selecionadas entre aquelas onde foram mantidas produções superiores a 500 litros diários ao longo do ano, ou, pelo menos, durante a maioria dos meses. A produção média diária de leite por vaca, nos diversos rebanhos considerados, situava-se entre 12 e 15 litros e, em termos de volume de colostro obtido na primeira ordenha, valores entre 0,5 a 5 litros foram observados.

Inicialmente, os animais com previsão de parto dentro do período compreendido entre junho e setembro de 1999 foram distribuídos em quatro grupos de acordo com o grau de sangue holandês, conforme se segue: Grupo 1 = menos de 70% de grau de sangue holandês (19 vacas); Grupo 2 = animais  $\frac{3}{4}$  HZ (46 vacas); Grupo 3 = mestiços entre 80 e 90 % de grau de sangue holandês, que corresponderam a  $\frac{13}{16}$  HZ e  $\frac{7}{8}$  HZ (11 vacas); Grupo 4 = vacas com mais de 90% de grau de sangue holandês (12 animais). Após o parto, amostras representativas de colostro da primeira ordenha foram obtidas de 88 vacas híbridas e, posteriormente, submetidas a determinações dos níveis de IgG, inibidores de tripsina e lactoferrina. Para a primeira e a última variáveis referidas, utilizou-se como metodologia a imunodifusão radial simples e, no caso dos

inibidores de tripsina, foi empregada técnica colorimétrica tendo-se como substrato D,L-BApNA.

Nas condições do presente experimento, pode-se concluir que:

1. Os níveis colostrais de IgG e inibidores de tripsina não são influenciados pelo grau de sangue, mas o mesmo não ocorre com as concentrações de lactoferrina.
2. Em comparação com animais de raças taurinas leiteiras, os níveis médios de inibidores de tripsina do colostro de vacas mestiças holandês-zebu equiparam-se ou até mesmo superam os valores descritos, mas as concentrações médias de IgG são bastante superiores.
3. A alta variabilidade dos níveis de lactoferrina dos grupos estudados impossibilita a obtenção de uma estimativa da média representativa desta variável.
4. A grande amplitude do intervalo de confiança para a média de IgG não desqualifica o colostro de animais mestiços holandês-zebu, já que o seu limite inferior é bastante elevado.
5. Não se justifica o emprego de métodos artificiais de fornecimento do colostro e tampouco uma avaliação prévia de densidade da referida secreção, no caso de mestiços holandês-zebu.
6. O nível elevado de IgG observado no colostro sugere que a adoção da prática da mamada natural assistida seja adequada para assegurar que não haja falha de transferência de imunidade passiva.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A GUIDE to colostrum and colostrum management for dairy calves (17 Dez. 1998). Washington, Animal and Plant Health Inspection Service. Consultado em 25 de fevereiro de 1999. 7p. ([http://www.aphis.usda.gov:80/vs/ceah/cahm/Dairy\\_Cattle/ndep/bamn2.htm](http://www.aphis.usda.gov:80/vs/ceah/cahm/Dairy_Cattle/ndep/bamn2.htm))
- BAINTNER, K., CSAPÓ, J. Lack of acid-resistant trypsin inhibitor in mare's colostrum: short communication. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 44, n. 1, p. 95-97, 1996.
- BANKS, K.L., MCGUIRE, T.C. Neonatal immunology. In: HALLIWELL, R.E.W., GORMAN, N.T. (Ed.). **Veterinary clinical immunology**. Philadelphia: Saunders, 1989. p. 193-204.
- BESSER, T.E., GAY, C.C. Colostral transfer of immunoglobulins to the calf. **Veterinary Annual**, v.33, p. 53-61, 1993.
- BESSER, T.E., GAY, C.C., PRITCHETT, L. Comparison of three methods of feeding colostrum to dairy calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 198, n.3, p. 419-422, 1991.
- BESSER, T.E., GAY, C.C. The importance of colostrum to the health of the neonatal calf. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 10, n. 1, p. 107-117, 1994.

- BRENNER, J., NERIA, A., ASKENAZY, G., PAZ, R., MEIROM, R., UNGARWARON, H., TRAININ, Z. A lactogenic-immune-deficiency syndrome in cows: unexplained phenomenon. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 32, n.3-4, p.315-324, 1992.
- BROCK, J.H., ARZABE, F.R., ORTEGA, F., PIÑEIRO, A. The effect of limited proteolysis by trypsin and chymotrypsin on bovine colostrum IgG1. **Immunology**, v. 32, n. 2, p. 215-219, 1977a.
- BROCK, J.H., ARZABE, F.R., PIÑEIRO, A., OLIVITO, A.M. The effect of trypsin and chymotrypsin on the bactericidal activity and specific antibody activity of bovine colostrum. **Immunology**, v. 32, n. 2, p. 207-213, 1977b.
- BROCK, J.H., PIÑEIRO, A., LAMPREAVE, F. The effect of trypsin and chymotrypsin on the antibacterial activity of complement, antibodies, and lactoferrin and transferrin in bovine colostrum. **Annales de Recherche Vétérinaire**, v.9, n.2, p. 287-294, 1978.
- CAMPOS, O. F., LIZIERE, R. S. Estratégia para obtenção de fêmeas de reposição em rebanhos leiteiros. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL, 10, 1998, Piracicaba. **Anais ... Piracicaba: FEALQ**, 1998. p. 215-255.
- CARLSSON, A., BJÖRCK, L., PERSSON, K. Lactoferrin and lysozyme in milk during acute mastitis and their inhibitory effect in delvotest P. **Journal of Dairy Science**, v.72, n. 12, p. 3166-3175, 1989.
- CECHOVÁ, D. Trypsin inhibitor from cow colostrum. **Methods in Enzymology**, v. 45, p.806-8013, 1976.
- DONOVAN, G.A., DOHOO, I.R., MONTGOMERY, D.M., BENNETT, F.L. Associations between passive immunity and morbidity and mortality in dairy heifers in Florida, USA. **Preventive Veterinary Medicine**, v.34, n. 1, p. 31-46, 1998.
- ERLANGER, B.F., KOKOWSKY, N., COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, n. 2, p. 271-278, 1961.

- GARRY, F., ADAMS, R., ALDRIDGE, B. Role of colostrum transfer in neonatal calf management: current concepts in diagnosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 15, n. 8, p. 1167-1174, 1993.
- GAY, C.C, BESSER, T.E. Colostrum and feeding management of dairy calf during the first two days of life. In: NAYLOR, J.M., RALSTON, S.L. (Eds.). **Large animal clinical nutrition**. St. Louis: Mosby Year Book, 1991. p. 243-247.
- GUY, M.A., McFADDEN, T.B., COCKRELL, D.C., BESSER, T.E. Regulation of colostrum formation in beef and dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.77, n. 10, p. 3002-3007, 1994.
- HONKANEN-BUZALSKI, T., SANDHOLM, M. Trypsin-inhibitors in mastitic milk and colostrum: correlation between trypsin-inhibitor capacity, bovine serum albumin and somatic cell contents. **Journal of Dairy Research**, v. 48, n. 2, p. 213-233, 1981.
- HOPKINS, F.M., DEAN, D.F., GREENE, W. Failure of passive transfer in calves: comparison of field diagnosis methods. **Modern Veterinary Practice**, v. 65, n. 8, p. 625-628, 1984.
- HOPKINS, B.A., QUIGLEY, J.D. Effects of method of colostrum feeding and colostrum supplementation on concentrations of immunoglobulin G in the serum of neonatal calves. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 5, p. 979-983, 1997.
- HURLEY, W.L., GRIEVE, R.C.J., MAGRURA, C.E., HEGARTY, H.M., ZOU, S. Electrophoretic comparisons of lactoferrin from bovine mammary secretions, milk neutrophils and human milk. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 2, p. 377-387, 1993.
- JENSEN, P.T., PEDERSEN, K B. The influence of sow colostrum trypsin inhibitor on the immunoglobulin absorption in newborn piglets. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 23, n. 2, p. 161-168, 1982.

- JENSEN, P.T. Trypsin inhibitor and immunoglobulins in porcine colostrum. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 19, n. 3, p. 475-477, 1978.
- JOHNSON, A.M. Immunoprecipitation in gels. In: ROSE, N.R., FRIEDMAN, H., FAHEY, J.L. (Eds.). **Manual of clinical laboratory immunology**. 3. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1986. p. 14-24.
- KAKADE, M.L., SIMONS, N., LIENER, I.E. An evaluation of natural versus synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. **Cereal Chemistry**, v. 46, p. 518-525, 1969.
- KRUSE, V. Yield of colostrum and immunoglobulin in cattle at the first milking after parturition. **Animal Production**, v. 12, n. 4, p. 619-626, 1970.
- LASKOWSKI, M., LASKOWSKI, M. Crystalline trypsin inhibitor from colostrum. **Journal of Biological Chemistry**, v.190, p. 563-573, 1951.
- LEE, W.J., FARMER, J.L., HILTY, M., KIM, Y.B. The protective effects of lactoferrin feeding against endotoxin lethal shock in germfree piglets. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 4, p. 1421-1426, 1998.
- LEVIEUX, D., OLLIER, A. Bovine immunoglobulin G,  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactoalbumin and serum albumin in colostrum and milk during the early post partum period. **Journal of Dairy Research**, v. 66, n. 3, p. 421-430, 1999.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. RANDAL, R.J. Protein measurements with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- McKENNEY, M.M., PARKINSON, A. A simple, non-chromatography procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluids. **Journal of Immunological Methods**, v. 96, p. 271-278, 1987.
- MORIN, D.E., McCOY, G.C., HURLEY, W.L. Effects of quality, quantity, and timing of colostrum feeding and addition of a dried colostrum supplement on immunoglobulin G<sub>1</sub> absorption in holstein bull calves. **Journal of Dairy Science**, v. 80,n. 4, p.747-753, 1997.



- MULLER, L.D., ELLINGER, D.K. Colostral immunoglobulin concentrations among breeds of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 8, p. 1727-1730, 1981.
- NONNECKE, B. J., SMITH, K.L. Biochemical and antibacterial properties of bovine mammary secretion during mammary involution and at parturition. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 12, p. 2863-2872, 1984.
- NORMAN, L.M., HOHENBOKEN, W.D., KELLEY, K.W. Genetic differences in concentration of immunoglobulins G<sub>1</sub> and M in serum and colostrum of cows and in serum of neonatal calves. **Journal of Animal Science**, v. 53, n. 6, p. 1465-1472, 1981.
- OYENIYI, O.O., HUNTER, A.G. Colostral constituents including immunoglobulins in the first three milkings postpartum. **Journal of Dairy Science**, v. 61, n. 1, p.44-48, 1978.
- PARISH, S.M. Ruminant immunodeficiency diseases. In: SMITH, B.P. (Ed.). **Large animal internal medicine**. 2. ed. St. Louis: Mosby, 1996. p. 1857-1860.
- PEDERSEN, V.B., KEIL-DLOUHÁ, V., KEIL, B. On the properties of trypsin inhibitor from human and bovine colostrum. **FEBS Letters**, v.17, n.1, p. 23-26, 1971.
- PENHALE, W.J., CHRISTIE, G. Quantitative studies on bovine immunoglobulins I. Adult plasma and colostrum levels. **Research in Veterinary Science**, v. 10, n. 6, p. 493- 501, 1969.
- PERINO, L.J. A guide to colostrum management in beef cows and calves. **Veterinary Medicine**, v. 92, n. 1, p. 75-82, 1997.
- PERINO, L.J., WITTUM, T.E., ROSS, G.S. Effects of various risk factors on plasma protein and serum immunoglobulin concentrations of calves at postpartum hours 10 and 24. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 9, p. 1144-1148, 1995.

PIÑEIRO, A., BROCK, J.H., ESPERANZA, I. Isolation and properties of bovine colostrum trypsin inhibitor. **Annales de Recherche Vétérinaire**, v. 9, n. 2, p. 281-286, 1978.

PIÑEIRO, A., ORTEGA, F., URIEL, J. Trypsin inhibitor from cow colostrum isolation, electrophoretic characterization and immunologic properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 379, n. 1, p. 201-206, 1975.

PRITCHETT, L.C., GAY, C.C., BESSER, T.E., HANCOCK, D.D. Management and production factors influencing immunoglobulin G<sub>1</sub> concentration in colostrum from holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 7, p. 2336-2341, 1991.

QUIGLEY, J.D., MARTIN, K.R., BEMIS, D.A., POTGIETER, L.N.D., REINEMEYER, C.R., ROHRBACH, B.W., DOWLEN, H.H., LAMAR, K.C. Effects of housing and colostrum feeding on serum immunoglobulins, growth, and fecal scores of jersey calves, **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 4, p. 893-901, 1995a.

QUIGLEY, J.D., MARTIN, K.R., DOWLEN, H.H. Concentrations of trypsin inhibitor and immunoglobulins in colostrum of jersey cows. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 7, p. 1573-1577, 1995b.

QUIGLEY, J.D., MARTIN, K.R., DOWLEN, H.H., LAMAR, K.C. Addition of soybean trypsin inhibitor to bovine colostrum: effects on serum immunoglobulin concentrations in jersey calves. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 4, p. 886-892, 1995c.

QUIGLEY, J.D. **UT calf notes**. Knoxville: University of Tennessee; Institute of Agriculture, 1997. 16 p.

QUIGLEY, J.D., MARTIN, K.R., DOWLEN, H.H., WALLIS, L.B., LAMAR, K. Immunoglobulin concentration, specific gravity, and nitrogen fractions of colostrum from Jersey cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 1, p. 264-269, 1994.

RADOSTITS, O. M., GAY, C.C., BLOOD, D. C., HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary medicine**. 9. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000. 1877p.

- RADOSTITS, O.M., LESLIE, K.E., FTROW, J. **Heard health: food animal production medicine** 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1994. 631 p.
- REITER, B., BROCK, J.H., STEEL, E.D. Inhibition of *Escherichia coli* by bovine colostrum and post-colostral milk, II. The bacteriostatic effect of lactoferrin on a serum susceptible and serum resistant strain of *E. coli*. **Immunology**, v. 28, n. 1, p. 83-95, 1975.
- REITER, B. Review of nonspecific antimicrobial factors in colostrum. **Annales de Recherche Vétérinaire**, v. 9, n. 2, p. 205-224, 1978.
- SANCHEZ, L., ARANDA, P., PREZ, M.D., CALVO, M. Concentration of lactoferrin and transferrin throughout lactation in cow's colostrum and milk. **Biological Chemistry Hoppe Seyler**, v. 369, n. 9, p. 1005-1008, 1988.
- SANCHEZ, L., LUJAN, L., ORIA, R., CATILLO, H., PEREZ, D., ENA, J.M., CALVO, M. Synthesis of lactoferrin and transport of transferrin in the lactating mammary gland of sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 5, p. 1257-1262, 1992.
- SANDHOLM, M., HONKANEN-BUZALSKI, T. Colostral trypsin inhibitor capacity in different animal species. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 20, n. 4, p. 469-476, 1979.
- SELIM, S.A., BRADFORD, P.S., CULLOR, J. S., BLANCHARD, P., FARCER, T.B., HOFFMAN, R., DILLING, G., RODEN, L., WILGENBURG, B. Serum immunoglobulins in calves: their effects and two easy, reliable means of measurement. **Veterinary Medicine**, v. 90, n. 4, p. 387- 404, 1995.
- STALEY, T.E., BUSH, L.J. Receptor mechanisms of the neonatal intestine and their relationship to immunoglobulin absorption and disease. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 1, p. 184-205, 1985.
- STOTT, G.H., MARX. D. B., MENEFEE, B.E., NIGHTENGALE, G.T. Colostral immunoglobulin transfer in calves. II. The rate of absorption. **Journal of Dairy Science**, v. 62, n.11, p.1766-1773, 1979.

- TIZARD, I.R. **Veterinary immunology: an introduction**. 5 ed. Philadelphia: Saunders, 1996. 531p.
- TSUJI, S., HIRATA, Y., MUKAI, F., OHTAGAKI, S. Comparison of lactoferrin content in colostrum between different cattle breeds. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 1, p. 125-128, 1990.
- TYLER, J.W., HANCOCK, D. D., PARISH, S.M., REA, D.E., BESSER, T.E., SANDERS, S.G., WILSON, L.K. Evaluation of 3 assays for failure of passive transfer in calves. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 10, n. 5, p. 304-307, 1996.
- TYLER, J.W., STEEVENS, B.J., HOSTLER, D.E., HOLLE, J.M., DENBIGH, J.L. Colostral immunoglobulin concentration in holstein and guernsey cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 9, p. 1136-1139, 1999.
- VANN, R.C., HOLLOWAY, J.W., CARSTENS, G.E., BOYD, M.E., RANDEL, R.D., Influence of calf genotype and colostral immunoglobulins in *Bos taurus* and *Bos indicus* and serum immunoglobulins in their calves. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 10, p. 3044-3050, 1995.
- WATERMAN, D. **Colostrum: the beginning of a successful calf raising program**. Iowa: Dairy Quality Assurance Center, 1998. 4p.
- WATTIAUX, M. **Heifer raising – birth to weaning: importance of colostrum feeding**. Madison: The Babcock Institute; University of Wisconsin, 1997. 6p.